

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MIRELLA SOLIANI PRADA

**O USO DE ELICITORES NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
POR CULTURAS *IN VITRO* DE PLANTAS: UMA REVISÃO**

**FLORIANÓPOLIS
2018**

Mirella Soliani Prada

**O USO DE ELICITORES NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
POR CULTURAS *IN VITRO* DE PLANTAS: UMA REVISÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de
Ciências Biológicas da UFSC como requisito básico para a
obtenção do título de licenciada em Ciências Biológicas.
Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Viana

Florianópolis

2018

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Dra. Ana Maria Viana pela orientação, por me receber com um prazo apertado e possibilitar a realização deste trabalho.

Aos professores da UFSC que fizeram parte da minha formação, que me abriram os olhos e me encantaram com diferentes áreas da biologia.

Aos meus colegas de classe e amigos que fiz no decorrer desta jornada, vocês deixaram a graduação mais leve e divertida.

Aos meus pais por me possibilitarem concluir a graduação, estando sempre ao meu lado, me aconselhando ajudando por todos estes anos.

A minha família que sempre me apoiou e sempre esteve presente, e tantas outras pessoas queridas que me acompanharam nessa caminhada.

RESUMO

O uso de metabólitos secundários está presente há séculos na história da humanidade, fazendo parte, principalmente, da medicina tradicional. O conhecimento do metabolismo secundário vegetal tem trazido diversos compostos de importância econômica para a população, sendo estes utilizados na medicina, farmácia, alimentação, fragrâncias, cosméticos e biopesticidas. Culturas de células e tecidos favorecem um aumento na produção destes compostos *in vitro*, apresentando vantagens quanto à produção em condições controladas, o monitoramento e a manipulação das culturas, o espaço reduzido de produção e um ambiente livre de patógenos, predadores e adversidades climáticas. . Em conjunto com as culturas de células e tecidos tem se estudado e avaliado a utilização e o funcionamento de elicitores para aumentar a produção de compostos de interesse. O objetivo deste trabalho é avaliar as pesquisas que tem sido realizadas nos últimos dez anos, analisando-se os tipos de elicitores utilizados, os tipos de sistemas de cultura *in vitro* empregados e a taxa de sucesso na produção do composto desejado, além das possibilidades de escalonamento dos processos em biorreatores e dos casos em que os compostos já são produzidos em nível industrial. Os artigos selecionados mostraram aumentos significativos na produção de compostos de importância econômica, sendo estes em sua maioria vinculados à área farmacêutica. Este tipo de pesquisa abre portas para se estudar novos compostos que possam vir a ser utilizados como medicamentos, na indústria de cosméticos ou agronegócios, além de poder promover uma produção em larga escala do composto, sem retirar o mesmo de fontes naturais e contribuindo para a conservação de recursos genéticos vegetais.

Palavras-chave: Elicitores, metabólitos secundários, cultura *in vitro* de células vegetais.

ABSTRACT

The use of secondary metabolites has been present for centuries in the humankind history, primarily on traditional medicine. The knowledge of secondary plant metabolism has brought several compounds of economic importance for the population, which are used in medicine, pharmacy, food, fragrances, cosmetics and biopesticides. Cell and tissue cultures show an increase in the production of these compounds, presenting advantages in their production under a controlled environment, the culture monitoring and manipulation, the reduced physical area needed for production and an environment free of pathogen, predators and protected against climate changes. . In conjunction with cell and tissue cultures the uses and elucidation of elicitor action mechanism have been extensively studied and evaluated aiming to increase the production of compounds of interest. The objective of this work is to evaluate the scientific researches that have been carried out in the last ten years, analyzing which elicitors have been used, which type of *in vitro* culture system have been deployed, the e success rate in the production of the desired compound, the scaling up processes and the cases studies on the industrial production . The articles selected showed significant increases in the production of compounds of economic importance, and these are mostly linked to the pharmaceutical area. This type of research opens doors to study new compounds that may be used as medicines, used in the cosmetics industry or agribusiness, and can promote large-scale production of the compound without removing it from natural sources and ensuring the conservation of plant genetic resources.

Key words: Elicitors, secondary metabolites, plant cell culture.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de elicitores bióticos e abióticos utilizados em pesquisas com plantas.....	18
Quadro 2 - Compostos fabricados por empresas.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Artigos científicos recentes que utilizam MeJa como elicitor.....	22
Tabela 2 - Artigos científicos recentes que utilizam SA como elicitor.....	24
Tabela 3 - Artigos científicos recentes que utilizam quitosana como elicitor.....	26
Tabela 4 - Artigos científicos recentes que utilizam alginato como elicitor.....	28
Tabela 5 - Artigos científicos recentes que utilizam extrato de levedura como elicitor.....	30
Tabela 6 - Artigos científicos que utilizam biorreator para produzir metabólitos secundários.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

avr - Gene de avirulência

DMAPP - Dimetialil difosfato

MS - Massa seca

IPP - Isopentenil difosfato

JA - Ácido jasmônico

MeJa - Metil jasmonato

MEP - Metileritritol fosfato

Mg GAE/g MS - Miligrama de ácido gálico por grama de massa seca

ppm - Partes por milhão

R - Gene de resistência

SA - Ácido salicílico

SAR - Resistência sistêmica adquirida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivos gerais.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. METODOLOGIA.....	13
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
4.1. Metabólitos secundários.....	14
4.1.1. Compostos fenólicos.....	14
4.1.2. Terpenos.....	15
4.1.3. Compostos nitrogenados.....	16
4.2. Elicitores.....	17
4.2.1. Mecanismo de ação.....	18
4.3. Utilização de elicitores em sistemas de cultura <i>in vitro</i> de células, tecidos e órgãos vegetais.....	19
4.3.1. Sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de plantas utilizadas para a produção de metabólitos secundários.....	19
4.3.2. Pesquisas científicas com elicitores.....	21
4.3.2.1. Metil jasmonato.....	21
4.3.2.2. Ácido salicílico.....	23
4.3.2.3. Quitosana.....	25
4.3.2.4. Alginato.....	26
4.3.2.5. Extrato de levedura.....	29
4.4. Produção em larga escala: biorreatores.....	30
4.5. Produção comercial de metabólitos secundários.....	32
5. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários vêm sendo utilizado pela humanidade muito antes de se entender o que eram. Papiros encontrados próximo à tumba mortuária de Ramsés II, no Egito, associa alguns remédios de origem vegetal para tratar certas doenças. Artigos arqueológicos mostram o uso de plantas por culturas antigas ao redor do mundo, noz de bétele, conhecida por possuir compostos psicoativos, eram mascaradas há mais de 10.000 anos no Timor, o uso da folha de coca no Equador datam cerca de 5.000 anos, civilizações latino-americanas, como os Incas, Astecas e Maias utilizavam a quina, ipecacuanha e coca para fins medicinais. De maneira geral o uso de plantas para fins medicinais são estudados há séculos, e os registros arqueológicos deixados serviram de base para muitos estudos posteriores (PINTO *et al*, 2002).

O primeiro conhecimento sobre metabolismo secundário vegetal se deu no meio do século XIX, quando Julius Sachs publicou em seu livro a diferenciação do metabolismo primário ao secundário, dizendo que existiam compostos provenientes do metabolismo vegetal que não possuíam a utilidade de formar novas células, sendo então considerados produtos de importância desconhecida, sendo tratados por muito tempo como produtos desperdiçados pela planta (*waste products*), compostos provenientes do metabolismo primário que eram formados sem propósito para o vegetal. As pesquisas com metabólitos secundários só ganharam força no século XX, quando químicos começaram a isolar compostos e associá-los aos tecidos vegetais em que foram encontrados, bem como separá-los em classes (terpenóides, alcalóides, flavonóides, entre outros) e quantificar o composto presente. Friedrich Wilhelm Sertürner deu início às pesquisas de produtos naturais isolando a morfina a partir do ópio, considerando-a inicialmente um sonífero (*principium somniferum*), a qual foi totalmente elucidada nos anos 1950 (HARTMANN, 2007; WINK, 2003). Um melhor entendimento da função dos metabólitos secundários para as plantas começou a ser cogitado por ecologistas e zoólogos, os quais relacionavam a predação e o parasitismo com reações de defesa vegetal, cogitando então a ideia de que os metabólitos secundários estariam relacionados com mecanismos de defesa da planta (HARTMANN, 2007).

Inicialmente as pesquisas eram focadas em isolar compostos naturais para tentar sintetizá-los e entender sua formação dentro da planta, traçando sua rota bioquímica. Com o entendimento da função dos metabólitos secundários as pesquisas deixaram de ser tão focadas na estrutura química dos compostos e sua replicação, e passaram a tentar entender como esses compostos produzidos pelos vegetais poderiam ser utilizados. Durante essa época houve um

grande número de pesquisas com culturas de células e tecidos vegetais, a fim de produzir estes compostos em laboratório, melhorando os protocolos de cultura de células (HARTMANN, 2007; WANG *et al*, 2017).

Já é compreendido que os metabólitos secundários são formados a partir de vias do metabolismo primário, e estes são utilizados na defesa vegetal, mas também para atrair polinizadores e dispersores de sementes. Os metabólitos secundários são sintetizados quando um patógeno ou predador entra em contato com a planta, impedindo que estes se espalhem. Esses compostos têm ainda a função de sinalização, podendo sinalizar plantas próximas que há um ataque patogênico ou predatório ocorrendo. Essa sinalização pode ocorrer também para atrair predadores do herbívoro que esteja predando a planta, dessa forma a planta atrai um predador para o seu parasita. Os óleos essenciais são também mecanismos de defesa, funcionando como repelentes (VIZZOTTO *et al*, 2010; WINK, 2003).

Os estudos que levaram ao uso dos metabólitos secundários na farmacologia têm como base os conhecimentos antigos sobre plantas medicinais, estudando-as para identificar quais compostos possuem princípios ativos que podem ser usados como fármacos (PINTO *et al*, 2002). Hoje, boa parte dos remédios encontrados em farmácias e utilizados na medicina tem como base algum princípio ativo vegetal, que são derivados de metabólitos secundários, como é o caso da morfina, utilizada como analgésico em casos de dores severas, da colchicina, utilizada no tratamento da gota e do taxol, utilizado no tratamento do câncer, entre outros compostos (GIRI & ZAHEER, 2016; FILHO & YUNES, 1998; PAVARINI *et al*, 2012).

Os compostos produzidos pelo metabolismo secundário estão presentes em frutas e vegetais, dando características a eles, como aromatizantes e corantes, e ainda são considerados nutricionalmente importantes para a nossa dieta (BAENAS *et al*, 2014). Compostos fenólicos como as antocianinas dão coloração a frutas e vegetais, fazem parte deste grupo as cianidinas e delphinidinas, dando coloração avermelhada e azulada respectivamente. Os taninos são compostos que dão sabor adstringente a certos alimentos, estando relacionados ao sabor ‘seco’ de alguns vinhos. A quinina é um alcalóide que confere sabor amargo, retirada da casca de *Cinchona* spp., é utilizada como aromatizante, estando presente na água tônica (SHAHIDI & HO, 2005; BAENAS *et al*, 2014). Os compostos fenólicos com capacidade antioxidante presentes em diversos vegetais são também considerados importantes para a nossa dieta, prevenindo doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas e alguns tipos de cânceres (SHAHIDI & HO, 2005; BAENAS *et al*, 2014).

Outro interesse econômico sobre os metabólitos secundários é na produção de biocontroladores capazes de substituir os agrotóxicos. O uso de pesticidas sintéticos na agricultura tem causado danos a polinizadores e resistência a patógenos de monoculturas, além de trazer malefícios à saúde humana. A busca por substitutos aos agrotóxicos tem aumentado, influenciando as pesquisas a trazer inseticidas naturais ao mercado. Os metabólitos secundários vegetais podem apresentar ação repelente, evitando predatismo e oviposição, alguns são tóxicos para certos herbívoros e outros ainda possuem sabor desagradável, afastando predadores (CELIS *et al* 2008; TAIZ & ZEIGER, 2004).

A produção de metabólitos secundários pelas plantas pode ser induzida por diversas condições ambientais como, estresses hídrico e nutricional, exposição a patógenos e predadores e à radiação ultravioleta, ou seja, fatores bióticos e abióticos influenciam a produção destes compostos, dessa forma existe uma dificuldade em produzir estes compostos em campo, de forma estável, uma vez que o ambiente não é controlado, podendo estar suscetível a variações sazonais e locais. As culturas *in vitro* garantem a possibilidade de se produzir os metabólitos secundários de interesse econômico em larga escala e de maneira estável e consistente, independente da época do ano e da localização. As vantagens das culturas de tecido e células vegetais são, entre outras, controlar o meio em que os mesmos irão crescer. A quantidade de metabólitos secundários produzidos pelo vegetal em cultura é pequena, por este motivo as pesquisas com elicitores são comuns, com o propósito de aumentar a produção destes compostos (FUMAGALI *et al*, 2008; MURTHY *et al*, 2014). Elicitores são compostos químicos que ativam as vias de defesa vegetal, induzindo a produção de metabólitos secundários pela planta, mimetizando a ação de um predador ou patógeno, ou causando estresse à planta (TAIZ & ZEIGER, 2004).

O estudo de metabólitos secundários é considerado recente na história da ciência, hoje ainda não se conhece completamente os compostos produzidos, mas acredita-se que existam muitos compostos a serem analisados e utilizados na farmacologia, agricultura e alimentação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo fazer um levantamento sobre os métodos mais utilizados, entre 2008 e 2018, de produção de metabólitos secundários por culturas de células e tecidos vegetais com o uso de elicitores.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar quais tipos de culturas *in vitro* tem sido mais utilizadas nos últimos dez anos
- Verificar quais compostos tem sido estudados e produzidos durante este período
- Avaliar a taxa de sucesso da produção de metabólitos secundários com o uso de elicitores nas culturas *in vitro*

3 METODOLOGIA

Foram feitas pesquisas nos sites “Science Direct”, “Scholar Google” e nas revistas “Plant Cell, Tissue and Organ Culture” e “Plant Cell Reports”.

As palavras chaves iniciais para a pesquisa foram uma combinação de “elicitor”, “plant”, “*in vitro* culture” e “secondary metabolites”.

Devido à restrição do tempo disponível para a realização deste trabalho foi optado por analisar pesquisas realizadas entre o período de 2008-2018, iniciando-se as buscas a partir de 2018. Os artigos foram selecionados por título e resumo, e então analisados. Os critérios de exclusão para um artigo foram não estar relacionados com metabólitos secundários, não usar elicitores e não utilizar os métodos em culturas de tecido ou células.

Foram selecionados 6 artigos para os tipos mais comuns de elicitores utilizados.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são substâncias orgânicas produzidas pelos vegetais específicas a algumas espécies ou grupos relacionados. Essas substâncias, em sua maioria, não têm relação direta com o crescimento da planta, não estando diretamente relacionadas à fotossíntese, respiração, assimilação de nutrientes, entre outras funções primárias. Esses compostos são conhecidos por suas funções ecológicas, sendo atrativo para polinizadores, importantes na defesa contra patógenos ou agindo na competição entre espécies; bem como sua importância na indústria farmacêutica, na agricultura e no melhoramento de plantas para uso comercial ou industrial (TAIZ & ZEIGER, 2004; WINK, 2003).

Os metabólitos secundários são originados, em sua maioria, a partir de rotas metabólicas provenientes do metabolismo primário da planta, e, como não estão relacionados com funções básicas dos vegetais e não estão presentes em todas as plantas de maneira igual, acreditava-se que estes compostos não tinham função, sendo formados e acumulados como produtos desnecessários (conhecidos como “waste products”) (SEIGLER, 1998; HARTMANN, 2007). Embora ainda não se entendesse a função dos metabólitos secundários nas plantas, o uso de tal já era comum em culturas antigas, sendo utilizadas as plantas como medicamento, alucinógenos, venenos e aromatizantes (PINTO *et al*, 2002; WINK, 2010). Hoje cerca de 100.000 compostos produzidos pelo metabolismo secundário já foram caracterizados, mas acredita-se que existam muito mais, uma vez que apenas 20-30% das plantas tenham sido estudadas em nível fitoquímico (WINK, 2010).

Existem três classes principais de metabólitos secundários, os compostos fenólicos, os terpenos e os compostos nitrogenados. Essas três classes são originadas por diferentes rotas metabólicas e apresentam estrutura química distintas (TAIZ & ZEIGER, 2004; VIZZOTTO *et al*, 2010).

4.1.1 Compostos fenólicos

Essa classe de metabólitos secundários é caracterizada por apresentar um grupo fenol (uma hidroxila ligada a um anel aromático) em sua composição química, sendo este um grupo com cerca de 10.000 compostos, apresentando diversas funções na planta (BAENAS *et al*, 2014; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Os compostos fenólicos são originados através de duas rotas metabólicas, a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico, onde a maior parte dos compostos fenólicos originados é proveniente da rota do ácido chiquímico. Esta rota se dá com a combinação de compostos derivados da glicólise e da rota da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos, sendo o ácido chiquímico um intermediário desta rota (TAIZ & ZEIGER, 2004; VIZZOTTO *et al*, 2010).

A lignina é um composto fenólico presente tanto no metabolismo primário quanto no secundário, sendo este um dos compostos mais abundantes nas plantas. Sintetizada a partir da fenilalanina, a lignina está presente no suporte da planta, aparecendo na parede celular de diferentes tecidos de sustentação, bem como no tecido vascular, auxiliando o transporte de água e sais minerais. Mas além dessa função a lignina ainda é importante contra a herbivoria e crescimento de patógenos, atuando como uma barreira ao crescimento do invasor, e, ao ligar-se com a celulose, torna menor a capacidade de digerir-la (TAIZ & ZEIGER, 2004; VIZZOTTO *et al*, 2010).

Outro composto fenólico de grande importância ecológica é a antocianina, estando presente na coloração das plantas, atuando como atrativo para polinizadores e dispersores de sementes. Ainda como atrativos de polinizadores existem as flavonas e flavonóis, que não são visíveis a olho nu, mas atraem insetos, estes ainda agem como protetores a raios UV-B, não estando exclusivamente presentes nas flores (BAENAS *et al*, 2014, TAIZ & ZEIGER, 2004).

Compostos como os isoflavonóides e os taninos são também importantes quando se trata de proteção à planta. Alguns isoflavonóides possuem ação inseticida, enquanto outros têm ação antimicrobiana, e ainda podem ter atividade antiestrogênica. Já os taninos são importantes contra a herbivoria, podendo se tornar tóxicos quando ingeridos, ou dificultando a digestão de herbívoros. Os taninos são ainda responsáveis pelo sabor adstringente em frutos imaturos, o qual não é consumido pelos animais (TAIZ & ZEIGER, 2004).

4.1.2 Terpenos

Os terpenos, ou terpenóides, são compostos formados por unidades isoprênicas, sendo o maior grupo de metabólitos secundários, apresentando mais de 30.000 compostos (HARTMANN, 2007). Os terpenos são sintetizados através da rota do ácido mevalônico e da rota do metileritritol fosfato (MEP). Na rota do ácido mevalônico três moléculas de acetil CoA são ligadas ao piruvato, gerando o ácido mevalônico, o qual é usado para gerar isopentenil difosfato (IPP). Na rota do MEP o piruvato reage com o gliceraldeído-3-fosfato,

formando metileritritol fosfato, que vai então formar o dimetialil difosfato (DMAPP). O IPP e DMAPP são moléculas pentacarbonadas ativas que participam da biossíntese dos terpenos sendo precursoras de moléculas maiores, podendo formar monoterpenos, sesquiterpenos, até politerpenóides (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Este grupo tem alguns compostos associados ao crescimento das plantas, estando então também presentes no metabolismo primário vegetal. As giberelinas são diterpenos, enquanto que os esteróis são derivados dos tripterpenos, sendo o primeiro um importante grupo de hormônios vegetais e o segundo um componente da membrana celular. Os terpenos também atuam na defesa das plantas contra herbivoria, como com os monoterpenos que possuem ação inseticida, sendo tóxicos para muitos insetos (SEIGLER, 1998; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Outra importância dos terpenos são com os óleos essenciais, uma mistura de monoterpenos e sesquiterpenos. Os óleos essenciais são responsáveis por odores específicos de certas plantas, presentes em suas folhas. Esses aromas tem ação repelente para alguns insetos, e podem ainda atrair predadores de insetos que estejam predando a planta (TAIZ & ZEIGER, 2004; WINK, 2003).

Dois terpenóides importantes contra a herbivoria de vertebrados são as saponinas e os cardenolídeos, onde as saponinas possuem ação detergente, podendo formar poros na membrana, e os cardenolídeos um gosto amargo, ambos tóxicos (WINK, 2003).

4.1.3 Compostos nitrogenados

Os compostos nitrogenados são caracterizados por possuírem nitrogênio em sua composição, sendo formados a partir de aminoácidos básicos. Os alcalóides, grupo de compostos nitrogenados, representam cerca de 15.000 metabólitos secundários de grande importância ecológica. Os compostos alcalóides apresentam grande toxicidade a mamíferos, e a outros herbívoros, atuando como agonistas ou antagonistas de neuroreceptores e neurotransmissores, sendo causa de mortes de gado por ingestão de plantas contendo alcalóides (TAIZ & ZEIGER, 2004; WINK, 2010).

Outros dois compostos nitrogenados de grande importância são os glicosídeos cianogênicos e os glucosinolatos, ambos liberam toxinas voláteis, agindo na defesa da planta contra a herbivoria. Plantas que produzem glicosídeos cianogênicos liberam ácido cianídrico quando lesadas, sendo este tóxico para grande parte de seus predadores. Já as plantas que

produzem glucosinolatos liberam produtos como isotiocianatos e nitrilas, que podem ser tóxicos para herbívoros ou agir como repelente (TAIZ & ZEIGER, 2004).

4.2 ELICITORES

Os metabólitos secundários estão relacionados principalmente com a defesa vegetal, sendo ativados após um ataque ou estresse sofrido pela planta. Quando o patógeno entra em contato com a planta uma reação em cadeia começa, de forma a sintetizar os compostos necessários para combater o patógeno (TAIZ & ZEIGER, 2004). São chamados elicitores compostos que ativam as vias de defesa vegetal, e consequentemente induzem a produção de metabólitos secundários (BAENAS *et al*, 2014). Por induzirem a produção destes metabólitos, o uso desses compostos é muito comum nas pesquisas científicas, e devido à importância dos metabólitos secundários, seja na agricultura, farmacologia ou biotecnologias, o número de pesquisas com elicitores tem crescido nos últimos anos (TAIZ & ZEIGER, 2004; KRISHNAN *et al*, 2018; FARAG *et al*, 2016).

Os elicitores podem ser de origem biótica ou abiótica, e vão provocar reações diferentes dependendo do tipo (Quadro 1). Elicitores bióticos são geralmente compostos originados dos patógenos ou predadores, ou ainda compostos presentes nas vias de defesa vegetal, como é o caso do ácido salicílico (SA) e de compostos derivados do jasmonato, como o metil jasmonato (MeJa) e ácido jasmônico (JA), sendo estes hormônios vegetais. Outros compostos como polissacarídeos, proteínas e ácidos graxos já foram estudados e apresentaram ação elicitora (ANGELOVA *et al*, 2006; BAENAS *et al*, 2014). Compostos mais complexos, onde a estrutura molecular não é totalmente conhecida são também utilizados, como com as leveduras e preparados de parede celular microbiana (ANGELOVA *et al*, 2006).

Os elicitores abióticos são menos usados que os bióticos, sendo citados em um número menor de pesquisas, mas são, ainda assim, bastante utilizados. Elicitores abióticos podem ser químicos (íons metálicos, etanol e sais inorgânicos), que atuam na integridade da membrana celular na planta, ou físicos (estresse osmótico, salino, nutricional, radiação UV), que, de modo geral, causam estresse à planta (ANGELOVA *et al*, 2006; BAENAS *et al*, 2014). Os elicitores podem ainda ser divididos em elicitores gerais e elicitores específicos, onde os elicitores gerais ativam a defesa vegetal por meio de mecanismos não específicos, sendo utilizados em diferentes espécies de plantas. Já os elicitores específicos são provenientes de patógenos e predadores, os quais estão associados a algum gene específico da planta, gerando

então uma resposta de defesa que cria resistência ao patógeno (EDER & COSIO, 1994; VASCONSUELO & BOLAND, 2007).

Quadro 1 – Lista de elicitores bióticos e abióticos utilizados em pesquisas com plantas

Elicitores		
Bióticos	Composição complexa	Extrato de levedura Parede celular fúngica Parede celular microbiana Esporos fúngicos
	Composição definida	Alginato Pectina Quitosana Quitina Glicoproteínas
	Hormônios vegetais	Ácido jasmônico Metil jasmonato Ácido salicílico Metil salicilato Etileno Citocinina
Abióticos	Químico	Ácido acético Etanol Eteno Silício Sais inorgânicos íons metálicos
	Físico	Radiação UV Estresse hídrico Salinidade Estresse osmótico

Fonte: Adaptado de Angelova *et al* (2006) e Baenas *et al* (2014).

4.2.1 Mecanismo de ação

O sistema de defesa da planta está presente em todas as suas células, de forma que, independente de onde haja predação ou infecção, a célula consegue dar uma resposta de defesa. O reconhecimento a algum ataque predatório ou patógeno se dá pela relação do gene de resistência (R) da planta e o gene de avirulência (*avr*) do patógeno. A planta possui receptores na membrana plasmática vegetal que, quando percebem a presença de patógeno, iniciam uma cascata de sinalização para a produção de defesa vegetal (BAENAS *et al*, 2014; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Assim que o receptor da membrana plasmática vegetal entra em contato com o patógeno e ativa o gene R, o fluxo iônico da membrana é alterado, entrando íons de Ca^{2+} e H^+ na célula e saindo K^+ e Cl^- , de forma a ativar reações oxidativas que agem na defesa da planta (TAIZ & ZEIGER, 2004; GIRI & ZAHEER, 2016).

O ácido salicílico (SA) e o ácido jasmônico (JA) participam também da resposta de defesa, atuando como mensageiros secundários (ANGELOVA *et al*, 2006). Durante a defesa da planta pode ocorrer morte celular no local da predação ou no local em que foi reconhecido o patógeno, de forma a não comprometer outras partes da planta. Outro mecanismo de defesa é a lignificação do local de predação, dificultando-a (ANGELOVA *et al*, 2006; TAIZ & ZEIGER, 2004). Após o ataque de algum patógeno a planta pode apresentar resistência a ataques futuros, chamada de resistência sistêmica adquirida (SAR). Logo depois do ataque inicial os níveis de SA aumentam na região, induzindo a SAR. Essa resistência é passada para todos os tecidos da planta, e podem ainda ser passados para plantas vizinhas, através do metil salicilato, um éster metil que age como sinal volátil, induzindo a SAR em tecidos distantes (GIRI & ZAHEER, 2016).

4.3 UTILIZAÇÃO DE ELICITORES EM SISTEMAS DE CULTURA *IN VITRO* DE CÉLULAS, TECIDOS E ÓRGÃOS VEGETAIS

4.3.1 Sistemas de cultivo *in vitro* de plantas utilizados para a produção de metabólitos secundários

O cultivo de plantas para a obtenção de compostos químicos apresenta diversas dificuldades, tendo em vista que as espécies vegetais crescem melhor em locais propícios para sua espécie, em solos com nutrientes e pH ideais e ambiente com temperaturas e umidade favorável. O cultivo de plantas em campo ainda demanda um espaço para que as plantas possam se desenvolver, e técnicas para evitar doenças e predatismo (ANDRADE, 2002).

De maneira geral cultivar esses vegetais *in vitro*, através das técnicas de culturas de células, tecidos e órgãos apresenta as vantagens de poderem ser feitas em um espaço reduzido, em meio de cultura artificial, contendo a fonte de carbono adequada, os macro e micronutrientes, fitorreguladores, utilizando-se protocolos que podem ser repetidos em qualquer lugar. Dessa forma, é possível otimizar o meio de cultura para promover o crescimento rápido das células ou órgãos e aumentar a produção de compostos do metabolismo secundário de interesse. Além disso, as culturas podem ser mantidas em

condições controladas de temperatura, fotoperíodo e intensidade luminosa. As culturas podem ainda ser manipuladas com elicitores que ajudem a produção dos compostos desejados, além de ser um espaço livre de agentes patogênicos (ANDRADE, 2002).

As culturas de células e tecidos são, portanto, amplamente utilizadas uma vez que, com esse método, a quantidade de compostos produzidos pode ser maior quando comparada às plantas em campo, podendo produzir o composto desejado em larga escala, diminuindo a área necessária para a produção, além de reduzir a demanda extrativista pela coleta de plantas diretamente do ambiente natural, contribuindo para a conservação dos recursos naturais, uma vez que os sistemas de cultura *in vitro* podem ser mantidos em laboratórios (SARKATE *et al*, 2017; CAI *et al*, 2012).

Com o cultivo *in vitro* existe ainda a possibilidade de manipular o meio em que a cultura irá crescer, adicionando-se os reguladores de crescimento mais adequados, nutrientes e elicitores, a fim de se obter uma eficiência máxima da produção (PERASSOLO *et al*, 2017).

Os sistemas de cultura *in vitro* de plantas que são utilizados para a produção de metabólitos secundários são diversos, podendo ser culturas de raízes, culturas de brotos, culturas de calos, suspensão de células, cultura de plantas produzidas por micropropagação e culturas de células, raízes e microplantas em biorreatores (PERASSOLO *et al*, 2017; UDOMSIN *et al*, 2018).

As culturas de raízes e de brotos são utilizadas quando o composto de interesse se encontra em maior quantidade nesses órgãos ou dependem do estágio de desenvolvimento da planta, sendo um tipo de cultura de fácil crescimento (PERASSOLO *et al*, 2017; UDOMSIN *et al*, 2018).

A micropropagação é pouco utilizada na produção de metabólitos secundários, mas é um bom método de cultivo *in vitro* quando os compostos a serem produzidos são encontrados exclusivamente ou preferencialmente nas folhas, como os óleos essenciais, que são produzidos em estruturas específicas. Dessa forma o cultivo de plântulas para a obtenção desses compostos apresenta bons resultados (BAYRAKTAR *et al*, 2016).

A cultura de suspensão de células é muito utilizada na produção de metabólitos secundários, sendo utilizada inclusive como um método de cultura adicional à outros tipos de culturas *in vitro*, para uma melhor produção dos compostos desejados (MAHENDRAN *et al*, 2018).

Exemplos dos diferentes tipos de cultura que podem ser utilizados serão mencionados abaixo.

4.3.2 Pesquisas científicas com elicitores

Os elicitores são moléculas adicionadas às culturas *in vitro* de forma a reproduzir um ataque patogênico ou predatório, induzindo então as plantas a produzirem metabólitos de defesa. Estes podem ainda ser hormônios vegetais que estão presentes na via de defesa do vegetal, como é o caso de hormônios vegetais que atuam na sinalização das vias de defesa, ou podem ser produzidos por estresses aos quais a planta é submetida, como estresse salino, osmótico ou por radiação UV, resultando também na produção de metabólitos secundários (TAIZ & ZEIGER, 2004; GIRI & ZAHEER, 2016).

Os metabólitos secundários produzidos nas culturas de células são quantitativamente menores aos produzidos em culturas *in vitro*, reforçando a importância de usar elicitores para produzir compostos de importância farmacológica e econômica. Os elicitores apresentam respostas diferentes em plantas diferentes, de acordo com o metabólito que se quer produzir. Dessa forma grupos semelhantes de plantas geralmente apresentam respostas semelhantes quando submetidas à elicitação (MURTHY *et al*, 2014; GIRI & ZAHEER, 2016).

Os elicitores comumente utilizados nos trabalhos científicos são das classes dos hormônios vegetais, da família dos jasmonatos e salicilatos. Elicitores bióticos como quitosana, quitina, glicoproteínas, extratos de leveduras e de fungos são também muito usados. Entre os menos usados estão o alginato, elicitores químicos e físicos, mas estes também apresentam resultados significativos (ANGELOVA *et al*, 2006; GIRI & ZAHEER, 2016).

4.3.2.1 Metil jasmonato

O MeJa faz parte da família dos jasmonatos, hormônio vegetal, e tem como uma das funções sinalizar as vias de defesa vegetal quando um patógeno ou predador entra em contato com a planta. Os jasmonatos atuam nas respostas a ataques de fungos, predatismo e estresses ambientais, como radiação UV e estresse osmótico. O MeJa, assim como o SA, não fazem parte dos compostos que causam estresse à planta ou compostos pertencentes aos patógenos e predadores, mas estão dentro das vias de defesa da planta, sendo então utilizado na elicitação de culturas (COHEN & FLESCHER, 2009).

O MeJa tem sido utilizado com sucesso em culturas de plantas que apresentam compostos farmacologicamente ativos, as quais produzem metabólitos com potencial para tratar diversas doenças. Alguns exemplos de trabalhos científicos em que foi utilizado esse

elicitador em culturas *in vitro* são apresentados na Tabela 1, em que são mostradas as espécies vegetais estudadas, o tipo de cultura *in vitro* utilizada, as concentrações do elicitador utilizadas, o tempo de exposição ao elicitador, os compostos formados, a promoção no aumento da produção e as respectivas referências bibliográficas.

Culturas de suspensão de células de *Thevetia peruviana*, a qual apresenta poder anticancerígeno, elicitadas com 3 μ M de MeJa apresentaram aumento significativo na produção de compostos fenólicos, onde o grupo tratado apresentou 4,476 \pm 0,097 mg GAE/g MS (miligramas de ácido gálico por grama de massa seca) de compostos fenólicos totais, enquanto o grupo controle obteve 3,250 \pm 0,381 mg GAE/g MS (MENDOZA *et al*, 2018).

O uso de *Ophiorrhiza mungos* como anticancerígeno também vem sendo estudado, a elicitação de culturas de brotos com 150 μ M de MeJa para produzir camptotecina resultou em 0,74 \pm 0,05 mg/g MS do composto, enquanto o grupo controle apresentou 0,14 \pm 0 mg/g MS de camptotecina (KRISHNAN *et al*, 2018).

Fagonia indica apresenta compostos com poder anticancerígeno, bem como compostos utilizados no tratamento de diabetes e hemorragias. O uso de 0,5 mg/L de MeJa na elicitação de culturas de suspensão de células a partir de raízes de *Fagonia indica* resultou em 6,0 mg GAE/g MS de compostos fenólicos, um aumento de 300% quando comparado ao grupo controle (KHAN *et al*, 2017), já na cultura de suspensão de células a partir de calos de *Fagoni indica* o aumento de compostos fenólicos totais foi de 92,6% (KHAN *et al*, 2018).

100 μ M de MeJa foi utilizado para elicitar cultura de raízes de *Rubia tinctorum* para produzir antraquinona, a qual vem sendo estudada para tratar hepatite C e câncer, tendo um aumento de 130% na produção do composto (PERASSOLO *et al*, 2017).

A *Salvia virgata* é uma planta utilizada na culinária por ser muito aromática, mas apresenta também compostos de interesses farmacológicos, sendo considerados antioxidantes e anti-inflamatórios. Compostos fenólicos de *Salvia virgata* foram obtidos a partir da elicitação de cultura de brotos utilizando 11,2 ppm de MeJa. Após 3 dias de elicitação houve um aumento desses compostos de 2,07 vezes sobre o grupo controle (DOWOM *et al*, 2017).

Tabela 1 - Artigos científicos recentes que utilizam MeJa como elicitador

Espécie vegetal	Tipo de cultura	Concentração do elicitador	Tempo de elicitação	Produto	Aumento na produção (vezes)	Referência
<i>Rubia tinctorum</i>	Cultura de raízes	100 μ M	7d	Antraquinona	2,3	Perassolo <i>et al</i> , 2017

<i>Salvia virgata</i>	Cultura de brotos	11,2 ppm	3d	Compostos fenólicos	2,1	Dowom <i>et al</i> , 2017
<i>Fagonia indica</i>	Suspensão de células	0,5 mg/L	33d	Compostos fenólicos	4,0	Khan <i>et al</i> , 2017
<i>Fagonia indica</i>	Suspensão de células	0,5 mg/L	32d	Compostos fenólicos	1,9	Khan <i>et al</i> , 2018
<i>Thevetia peruviana</i>	Suspensão de células	3µM	24h	Compostos fenólicos	1,5	Mendoza <i>et al</i> , 2018
<i>Ophiorrhiza mungos</i>	Cultura de brotos	150µM	72h	Camptotecina	7,0	Krishnan <i>et al</i> , 2018

4.3.2.2 Ácido salicílico

O ácido salicílico também é um hormônio vegetal, tendo seu funcionamento semelhante ao MeJa, sinalizando as vias de defesa vegetal quando um patógeno ou predador entra em contato com a planta, dessa forma, quando utilizado como elicitor, o SA ativa as vias de defesa induzindo o vegetal a produzir metabólitos secundários (BAYRAKTAR *et al*, 2016).

Alguns exemplos de trabalhos científicos em que foi utilizado o ácido salicílico como elicitor em culturas *in vitro* são apresentados na Tabela 2, em que são mostradas as espécies vegetais estudadas, o tipo de cultura *in vitro* utilizada, as concentrações do elicitor utilizadas, o tempo de exposição ao elicitor, os compostos formados, a promoção no aumento da produção e as respectivas referências bibliográficas.

A elicitação de *Stevia rebaudiana* a partir do SA têm mostrado resultados significativos. Na produção de esteviosídeos, utilizado como adoçante, a partir de cultura de calos, o uso de 100mM de SA resultou numa quantidade de $951,4 \pm 86,5$ ppm, enquanto o grupo controle apresentou $737 \pm 6,8$ ppm. Embora o esteviosídeo seja comumente obtido a partir das folhas de *Stevia rebaudiana*, a quantificação do composto nas culturas de calos apresentou um aumento de 2,2 vezes quando comparado aos resultados obtidos das folhas do vegetal (MEJÍA-ESPEJEL *et al*, 2018).

Estudo utilizando o SA em culturas de *Gentiana dinarica* para a produção de xantonas teve uma boa resposta ao elicitor. Xantonas são utilizadas como inseticidas, mas pesquisas têm mostrado seu potencial para o tratamento de doenças relacionadas ao fígado. 200µM de

SA adicionados a culturas de raízes de *Gentiana dinarica* produziu uma quantidade 7,7 vezes maior quando comparado ao grupo controle (KRSTIĆ-MILOŠEVIĆ *et al*, 2017).

Withania somnifera possui o composto vitanolido, o qual apresenta importância farmacológica como antitumoral, bem como potencial para o tratamento da doença de Parkinson e Alzheimer. Em culturas de raízes de *Withania somnifera*, utilizando 150µM de SA, o grupo elicitado apresentou um número 48,97 vezes maior do composto que o grupo controle (SIVANANDHAN *et al*, 2012).

A *Glycyrrhiza glabra*, conhecida como alcaçuz e muito utilizada na culinária, também foi utilizada em cultura de raízes a fim de produzir glicirrizina, composto com poder anti-inflamatório. O uso de 1mM de SA resultou em uma quantidade 4,1 vezes maior de composto quando comparado ao grupo não elicitado (SHABANI *et al*, 2009).

Gymnema sylvestre vem sendo estudada por possuir compostos farmacológicos para o tratamento da diabetes. Uma cultura de suspensão de células para produzir um de seus compostos, o ácido gimnemico, com a eliciação de 200µM de SA resultou em um aumento de 4,9 vezes do composto quando comparado ao grupo controle, apresentando uma quantidade de 43,27±0,80 mg/g MS de ácido gimnemico (CHODISETTI *et al*, 2015).

A *Psoralea corylifolia* é uma planta conhecida por possuir compostos importantes para o tratamento de problemas de pele, como a psoríase. Em culturas de suspensão de células elicitadas com SA, houve um aumento de 10,2 vezes na produção de psoraleno quando comparado ao grupo controle (GAJULA *et al*, 2018).

Tabela 2 - Artigos científicos recentes que utilizam SA como elicitor

Espécie vegetal	Tipo de cultura	Concentração do elicitor	Tempo de eliciação	Produto	Aumento na produção (vezes)	Referência
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Cultura de raízes	1mM	24h	Glicirrizina	4,1	Shabani <i>et al</i> , 2009
<i>Withania somnifera</i>	Cultura de raízes	150µM	4h	Vitanolido	48,9	Sivanandhan <i>et al</i> , 2012
<i>Gymnema sylvestre</i>	Suspensão de células	200µM	48h	Ácido gimnemico	4,9	Chodisetti <i>et al</i> , 2015
<i>Gentiana dinarica</i>	Cultura de raízes	200µM	7d	Xantonas	7,7	Krstić-Milošević <i>et al</i> , 2017
<i>Psoralea corylifolia</i>	Suspensão de células	100µM	18d	Psoraleno	10,2	Gajula <i>et al</i> , 2018

<i>Stevia rebaudiana</i>	Cultura de calos	100mM	24h	Esteviosídeos	1,3	Mejía-Espejel <i>et al</i> , 2018
--------------------------	------------------	-------	-----	---------------	-----	-----------------------------------

4.3.2.3 Quitosana

Quitosana é um polissacarídeo encontrado na parede celular de alguns fungos e no exoesqueleto de insetos e crustáceos, sendo utilizado na elicitação de plantas por promover uma resposta fisiológica de defesa, tendo como característica comum o estímulo da biossíntese de fitoalexinas pela planta, composto responsável pela defesa vegetal, a qual a planta cria uma barreira química de forma a evitar a propagação do patógeno (PICHYANGKURA & CHADCHAWAN, 2015; BRAGA & DIETRICH, 1987). A quitosana é muito utilizada por ser um elicitor de baixo custo e ter uma baixa toxicidade às plantas, a qual apresenta boa resposta na produção de metabólitos secundários (JIAO *et al*, 2018).

Alguns exemplos de trabalhos científicos utilizando a quitosana como elicitor em culturas *in vitro* são apresentados na Tabela 3, em que são mostradas as espécies vegetais estudadas, o tipo de cultura *in vitro* utilizada, as concentrações do elicitor utilizadas, o tempo de exposição ao elicitor, os compostos formados, a promoção no aumento da produção e as respectivas referências bibliográficas.

O uso de quitosana em cultura de raízes de *Isatis tinctoria* para a produção de flavonóides farmacologicamente importantes, utilizados no tratamento de Influenza A (H1N1) e na síndrome respiratória aguda grave (SARS), resultou em um aumento de 7,1 vezes sobre o grupo controle com o uso de 150 mg/L de quitosana (JIAO *et al*, 2018).

Plumbago indica conta com compostos como a plumbagina que são utilizados como bactericidas. A elicitação de culturas de raízes de *Plumbago indica* com 150 mg/L de quitosana resultou em um aumento de 4 vezes a produção do composto quando comparado ao grupo controle (JAISI & PANICHAYUPAKARANANT, 2016).

Tinospora cordifolia possui o composto Palmatina, um alcalóide com potencial farmacológico como antibiótico e hipoglicemiante, além de apresentar toxicidade contra insetos. Na cultura de suspensão de células elicitada com 50 mg/L de quitosana houve um aumento de 3,5 vezes na produção do composto (KUMAR *et al*, 2017).

Phyllanthus debilis apresenta taninos de interesse farmacológico, utilizados no tratamento de doenças hepáticas. Com 150 mg/L de quitosana em culturas de suspensão de

células, foi obtido 4850 mg/g MS de taninos na cultura elicitada, contra 677 mg/g MS no grupo controle (MALAYAMAN *et al*, 2017).

Proveniente da planta *Silybum marianum*, a silibinina é utilizada no tratamento de hepatite, bem como outras doenças hepáticas. 800 mg/L de quitosana em culturas de calos de *Silybum marianum* resultou em $5,77 \pm 0,30$ mg/g MS do composto, enquanto o grupo controle apresentou $3,70 \pm 0,33$ mg/g MS (GABR *et al*, 2016).

O uso de elicitores na produção de compostos de interesse farmacológico é facilmente encontrado na literatura, mas estes são também usados com outros propósitos, como é o caso da elicitação de culturas de *Azadirachta indica* em biorreatores, a fim de produzir azadiractina, um composto utilizado como biopesticida. O uso de 50 mg/L de quitosana resultou em $139,6 \pm 2,01$ mg/L de composto no grupo elicitado, enquanto o grupo controle apresentou $49,7 \pm 1,60$ mg/L de composto (PRAKASH & SRIVASTAVA, 2008).

Tabela 3 - Artigos científicos recentes que utilizam quitosana como elicitador

Espécie vegetal	Tipo de cultura	Concentração do elicitador	Tempo de elicitação	Produto	Aumento na produção (vezes)	Referências
<i>Azadirachta indica</i>	Biorreator	50 mg/L	3d	Azadiractina	2,8	Prakash & Srivastava, 2008
<i>Plumbago indica</i>	Cultura de raízes	150 mg/L	72h	Plumbagina	4,0	Jaisi & Panichayupakaranant, 2016
<i>Silybum marianum</i>	Cultura de calos	800 mg/L	14d	Silibinina	1,6	Gabr <i>et al</i> , 2016
<i>Phyllanthus debilis</i>	Suspensão de células	150 mg/L	72h	Taninos	7,2	Malayaman <i>et al</i> , 2017
<i>Tinospora cordifolia</i>	Suspensão de células	50 mg/L	16d	Palmatina	3,5	Kumar <i>et al</i> , 2017
<i>Isatis tinctoria</i>	Cultura de raízes	150 mg/L	36h	Flavonóides	7,1	Jiao <i>et al</i> , 2018

4.3.2.4 Alginato

O alginato, presente na parede celular de algas pardas, não é um elicitador muito utilizado em culturas de tecidos e células, mas pesquisas recentes trazem bons resultados

usando o alginato como elicitor. O seu funcionamento se assemelha a ataques de patógenos ou predatórios por herbívoros, ativando a via de defesa vegetal (BAYRAKTAR *et al*, 2016).

Tem se estudado ainda o uso do alginato para elicitar protoplastos. O alginato é utilizado para imobilizar protoplastos, funcionando também como elicitor, induzindo a produção de metabólitos secundários. Em culturas de células os elicitores agem de maneira diferente, dependendo do tipo de elicitor.

O alginato é um elicitor proveniente de algas pardas, mas age de forma semelhante à elicitores derivados de compostos estruturais da parede da célula vegetal, como o ácido galacturônico, que funciona, portanto, como um elicitor endógeno. Acredita-se que por ambos serem ácidos urônicos e possuírem estrutura molecular semelhantes, a planta reconheça o alginato de forma parecida como reconhece o ácido galacturônico. Quando autoclavado o alginato libera ainda polímeros de alginato, oligômeros e produtos da degradação induzida pelo calor da autoclavagem, os quais são também liberados quando o ácido galacturônico é autoclavado, e cada um desses subprodutos podem funcionar como elicitores sobre a célula vegetal e promover a produção de metabólitos secundários (AOYAGI, 2011).

O uso do alginato na imobilização de células se dá por este ser gelatinizado facilmente, além de poder promover um maior acúmulo de metabólitos secundários tanto na célula quanto no meio. A imobilização de células com o alginato, além de poder funcionar como elicitor, ainda pode funcionar alterando o meio físico, protegendo a célula de possível tensão de cisalhamento, bem como alterando a fisiologia da célula, uma vez que conforme as células se proliferam, elas se mantêm muito próximas, podendo ter conexão entre uma e outra (AOYAGI, 2011).

Trabalhos com imobilização de células para obtenção de metabólitos de interesse vêm sendo publicados desde 1979 com a imobilização de células de *Morinda citrifolia* para a obtenção de antraquinonas. Entre 1979 e 2006 outros artigos utilizando a imobilização de células com o alginato foram publicados, como a imobilização de células de *Catharanthus roseus* na produção de ajmalicinas (1980), *Capsicum frutescens* para produzir capsaicina (1985), *Coffea arabica* para obter metilxantinas (1987), *Lithospermum erythrorhizon* para produzir shiconina (1990) e *Nicotiana tabacum* produzindo compostos fenólicos e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos humano (2001) foram realizados na sequência (AOYAGI, 2011). Esse autor menciona que quando adicionados oligômeros de alginato em conjunto com o monopotássio 7-amino-1,3-naftalenodissulfonato (ANDS) a culturas de *Catharanthus roseus* ou *Wasabia japonica* se observou a presença destes na membrana celular e citoplasma, entendendo-se que o alginato com baixo peso molecular

consiga passar pela parede celular e se ligar aos receptores presentes na membrana. Dessa forma foi pensado na eliciação de protoplastos encapsulados em alginato (AOYAGI, 2011).

Exemplos da utilização de protoplastos imobilizados em alginato têm mostrado resultados interessantes: em protoplastos de *Catharanthus roseus* imobilizados com alginato, a produção de alcalóides apresentou um aumento quando comparada à células imobilizadas em alginato ou protoplastos imobilizados em agarose. Já em culturas de *Taxus cuspidata* usando protoplastos obtidos a partir de culturas de calos, a produção de paclitaxel foi 6 vezes maior à cultura de células (AOYAGI, 2011)

Alguns exemplos de trabalhos científicos utilizando o alginato como elicitor em culturas *in vitro* são apresentados na Tabela 4, em que são mostradas as espécies vegetais estudadas, o tipo de cultura *in vitro* utilizada, as concentrações do elicitor utilizadas, o tempo de exposição ao elicitor, os compostos formados, a promoção no aumento da produção e as respectivas referências bibliográficas.

Em culturas *in vitro* de microplantas de *Stevia rebaudiana* produzidas por micropropagação, onde se utiliza as folhas para analisar os compostos produzidos, o grupo elicitado com 0,5 g/L de alginato apresentou 14,54 mg/g MS de esteviosídeo, utilizado como adoçante, enquanto o grupo controle resultou em 1,56 mg/g MS (BAYRAKTAR *et al*, 2016).

Culturas de calos de *Glycine max* elicitadas com 2% p/v de alginato resultou em $0,3072 \pm 0,0449$ mg/g MS de gliceolina, um composto antioxidante e anti-inflamatório, enquanto o grupo controle resultou em $0,0036 \pm 0,0024$ mg/g MS do composto (WANG *et al*, 2018).

Na produção de antocianinas, as quais são responsáveis pela coloração de certos vegetais, o uso de 100 mg/L de alginato em cultura de suspensão de células de *Vitis vinifera* resultou em um aumento de 2,6 vezes a produção deste composto (CAI *et al*, 2012).

Células provenientes de calos de *Morus alba* foram imobilizadas com 2% de alginato e então cultivadas em cultura de suspensão de células para produzir mulberrosídeo A, utilizado na indústria de cosméticos. O composto obtido do grupo elicitado foi 9,4 vezes maior que o grupo controle (INYAI *et al*, 2015).

Tabela 4 - Artigos científicos recentes que utilizam alginato como elicitor

Espécie vegetal	Tipo de cultura	Concentração do elicitor	Tempo de eliciação	Produto	Aumento na produção (vezes)	Referências
<i>Vitis</i>	Suspensão de	100 mg/L	13d	Antocianinas	2,6	Cai <i>et al</i> ,

<i>vinifera</i>	células					2012
<i>Morus alba</i>	Suspensão de células	2%	120d	Mulberrosídeo A	9,4	Inyai <i>et al</i> , 2015
<i>Stevia rebaudiana</i>	Micropropagação	0,5 g/L	28d	Esteviosídeos	9,3	Bayraktar <i>et al</i> , 2016
<i>Glycine max</i>	Cultura de calos	2% p/v	3d	Gliceolina	85,3	Wang <i>et al</i> , 2018

4.3.2.5 Extrato de levedura

O extrato de levedura é considerado um elicitor de composição complexa, visto a quantidade de compostos presentes. A parede celular das leveduras apresenta entre outros componentes manoproteínas, beta-glucanos e quitina, enquanto sua membrana plasmática é constituída por proteínas, lipídios e esteróis (PORTU *et al*, 2016).

Estudos mostram que o uso de extrato de levedura aumenta a concentração de metabólitos secundários, sendo considerado um importante elicitor, porém os estímulos variam entre plantas, apresentando melhores resultados com diferentes concentrações do elicitor em diferentes tempos de elicitação (PORTU *et al*, 2016; MAQSOOD & ABDUL, 2017).

Alguns exemplos de trabalhos científicos em que foi utilizado o extrato de levedura como elicitor em culturas *in vitro* são apresentados na Tabela 5, em que são mostradas as espécies vegetais estudadas, o tipo de cultura *in vitro* utilizada, as concentrações do elicitor utilizadas, o tempo de exposição ao elicitor, os compostos formados, a promoção no aumento da produção e as respectivas referências bibliográficas.

O uso do extrato de levedura para obter metabólitos secundários farmacologicamente ativos é muito documentado na literatura. Culturas de suspensão de células de *Psoralea corylifolia* para a produção de Psoraleno, utilizado no tratamento de vitiligo e psoríase, mostrou resultados significativos quando elicitado com 1,5% v/v de extrato de levedura, resultando em um aumento de 4,1 vezes do composto (AHMED & BAIG, 2014).

O gengibre, muito utilizado na culinária, apresenta compostos anti-inflamatórios e antipiréticos. Cultura de calos de *Zingiber officinale* com 100 mg/L de extrato de levedura apresentou um aumento na produção de compostos fenólicos em 1,4 vezes (ALI *et al*, 2018).

Gloriosa superba foi utilizada em cultura de suspensão de células para a obtenção de colchicina, utilizada no tratamento de tumores. Com o uso de 300 mg/L de extrato de levedura

se obteve um valor 6 vezes maior de colchicina quando comparado ao grupo controle (MAHENDRAN *et al*, 2018).

Pueraria candollei apresenta isoflavonóides, como o miroestrol, que são utilizados para aliviar os sintomas da menopausa. Em culturas de raízes elicidadas com 1,0 mg/mL de extrato de levedura o grupo elicitado apresentou 117±11,3 mg/g MS, enquanto o grupo controle resultou em 77,9±6,63 mg/g MS do composto (UDOMSIN *et al*, 2018).

Salvia miltiorrhiza apresenta o composto tanshinona, utilizado para tratar problemas circulatórios. Em cultura de suspensão de células com 100 mg/L de extrato de levedura houve um aumento de 11,5 vezes do composto sobre o grupo controle (ZHAO *et al*, 2010). A *Salvia miltiorrhiza* em cultura de raízes com elicitação de 25 mg/L de extrato de levedura resultou em um aumento significativo de tanshinona quando comparado ao grupo controle, 4,8 vezes de aumento (WU & SHI, 2008).

Tabela 5 - Artigos científicos recentes que utilizam extrato de levedura como elicitor

Espécie vegetal	Tipo de cultura	Concentração do elicitor	Tempo de elicitação	Produto	Aumento na produção	Referências
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Cultura de raízes	25 mg/L	9d	Tanshinona	4,8	Wu & Shi, 2008
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Suspensão de células	100 mg/L	7d	Tanshinona	11,5	Zhao <i>et al</i> , 2010
<i>Psoralea corylifolia</i>	Suspensão de células	1,5% v/v	72h	Psoraleno	4,1	Ahmed & Baig, 2014
<i>Pueraria candollei</i>	Cultura de raízes	1,0 mg/mL	3d	Miroestrol	1,5	Udomsin <i>et al</i> , 2018
<i>Gloriosa superba</i>	Suspensão de células	300 mg/L	15d	Colchicina	6,0	Mahendran <i>et al</i> , 2018
<i>Zingiber officinale</i>	Cultura de calos	100 mg/L	21d	Compostos fenólicos	1,4	Ali <i>et al</i> , 2018

4.4 PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA: BIORREATORES

A utilização de biorreatores para produzir metabólitos secundários tem aumentado com o decorrer dos anos. Essa forma de cultura apresenta muitas vantagens quando se pretende produzir compostos em larga escala. Os biorreatores comumente utilizados são o reator de tanque agitado (STR), biorreator air lift e biorreator de coluna de bolhas (PAEK *et*

al, 2005; AHMADI-SAKHA *et al*, 2016; JIN *et al*, 2017). Com o uso de biorreatores é possível monitorar as condições da cultura online, como temperatura, pH e concentração de oxigênio, além de otimizar a assimilação de nutrientes por conta da circulação do meio (BAQUE *et al*, 2012).

Na Tabela 6 são apresentados alguns exemplos de emprego, com sucesso, de culturas *in vitro* em biorreatores, para a produção em larga escala dos metabólitos secundários.

Culturas de raízes de *Panax ginseng* e *Panax quinquefolium* mantidas em biorreator air lift com o uso de MeJa apresentaram um aumento de quatro vezes na produção de saponinas (ALI *et al*, 2005), já a cultura de *Panax ginseng* em biorreator de coluna de bolhas apresentou um aumento de 1,6 vezes na produção de saponinas usando diferentes concentrações de oxigênio (THANH *et al*, 2006).

Em culturas de raízes de *Panax quinquefolium* mantidas em biorreator nutrient sprinkle, utilizando extrato de levedura como elicitor, apresentou um aumento de 1,6 vezes na produção de ginsenosídeos (KOCHAN *et al*, 2017), já em cultura de raízes de *Panax quinquefolium* mantidas em biorreator air lift, o grupo elicitado com *Alternaria panax* apresentou 276,0±2,19 mg/L de ginsenosídeos, enquanto o grupo não elicitado apresentou 99,8±2,18 mg/L do composto (YU *et al*, 2016).

Oplopanax elatus apresentou um aumento de 1,4 vezes na produção de compostos fenólicos em cultura de raízes em biorreator air lift com ácido indol-3-butírico junto ao meio (JIANG *et al*, 2015). Em cultura de *Withania somnifera* mantidas em biorreator de coluna de bolhas, utilizando *P. indica* como elicitor, houve um aumento de 1,9 vezes na produção de vitanolido (AHLAWAT *et al*, 2017).

Tabela 6 - Artigos científicos que utilizam biorreator para produzir metabólitos secundários

Espécie vegetal	Biorreator usado	Produto	Aumento na produção (vezes)	Referência
<i>Panax ginseng</i> e <i>Panax quinquefolium</i>	Biorreator air lift	Saponinas	4,0	Ali <i>et al</i> , 2005
<i>Panax ginseng</i>	Biorreator de coluna de bolhas	Saponinas	1,6	Thanh <i>et al</i> , 2006
<i>Oplopanax elatus</i>	Biorreator air lift	Compostos fenólicos	1,4	Jiang <i>et al</i> , 2015
<i>Panax</i>	Biorreator air lift	Ginsenosídeo	2,8	Yu <i>et al</i> , 2016

quinquefolium

<i>Panax</i>	Biorreator nutrient	Ginsenosídeo	1,6	Kochan <i>et al</i> , 2017
<i>quinquefolium</i>	sprinkle			
<i>Withania somnifera</i>	Biorreator de coluna de bolhas	Vitanolido	1,9	Ahlawat <i>et al</i> , 2017

4.5 PRODUÇÃO COMERCIAL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O uso de culturas de células e órgãos para produção de metabólitos secundários de interesse econômico já é utilizado em escala comercial, como pode ser observado no quadro 2. Empresas como a Phyton Biotech já mantêm uma linhagem de células de *Taxus* spp. em criopreservação, reproduzindo-as *in vitro*, podendo então produzir o composto de interesse sem que seja necessário o extrativismo de plantas dessa espécie na natureza, que são árvores de crescimento lento e que estão ameaçadas de extinção (PHYTON BIOTECH).

Observa-se, nos exemplos abaixo, que os metabólitos produzidos são utilizados em áreas como alimentação, cosméticos e farmacêuticos. Os compostos fabricados estão presentes em medicamentos anticancerígenos, anti-inflamatórios, antibióticos, bem como corantes e aromatizantes utilizados na indústria de alimentos, e estão ainda presentes nos cosméticos, como corantes ou ativos em cosméticos de tratamento de beleza (WILSON & ROBERTS, 2012; OCHOA-VILLARREAL, 2016).

Produtos que já estão sendo fabricados por empresas estão detalhados no quadro abaixo.

Quadro 2 – Compostos fabricados por empresas

Tipo de indústria	Espécie vegetal	Produto	Uso	Produtor
Farmacêutica	<i>Coptis japonica</i> e <i>Thalictrum minus</i>	Berberina	Antibiótico, anti-inflamatório e antitumoral	Mitsui Chemicals, Inc
	<i>Taxus</i> spp	Paclitaxel	Antitumoral	Phyton Biotech., Inc
Alimentícia	<i>Panax ginseng</i>	Ginseng	Suplemento	Nitto Denko Corporation

	<i>Euphorbia milii</i> e <i>Aralia cordata</i>	Antocianina	Corantes	Nippon Paint Co. Ltd
Cosmética	<i>Atropa belladonna</i> , <i>Carlina acaulis</i> , <i>Nicotiana glauca</i> e <i>Panax ginseng</i>	Atropina, ginsenosídeo, cumarina, camptotecina e anabasina	Cosméticos de tratamento	Rootec

Fonte: Adaptado de Ochoa-Villarreal, 2016.

5 CONCLUSÃO

Os metabólitos secundários produzidos naturalmente pela planta são, geralmente, em baixa quantidade. As pesquisas com elicitores tem mostrado um aumento de produção significativo em diversos compostos de importância econômica. Visto que os elicitores atuam de maneira diferente em espécies de plantas, pesquisas com diferentes tratamentos de elicitação podem mostrar qual o melhor tipo de elicitor para se ter um aproveitamento máximo do composto desejado. O cultivo de culturas *in vitro* apresenta diversas vantagens sobre a cultura em campo, seja por ser feita em ambiente controlado, por poder ser realizada em espaços menores ou por poder se manipular o meio em que a cultura irá crescer. Os tipos de cultura mais utilizados tem sido a cultura de suspensão de células e culturas de raízes, mas o tipo de cultura escolhido pode variar dependendo do composto a ser estudado e produzido.

De maneira geral tem se estudado compostos farmacologicamente ativos, de forma a conseguir produzi-los em grande quantidade, para que possam ser utilizados na medicina. Entre as pesquisas analisadas se concentram um grande número de artigos estudando compostos anticancerígenos. Os estudos com esses compostos levam muito em consideração a medicina tradicional, analisando plantas que são comumente utilizadas pela população. Cultivar estas plantas *in vitro* pode proporcionar uma diminuição da coleta do vegetal na natureza, um aumento da produção do composto e uma melhor administração do processo de produção do mesmo. O mesmo acontece com compostos nutricionalmente importantes, compostos utilizados na indústria de cosméticos e compostos com poder biopesticida.

De maneira geral os elicitores mais utilizados, e que trazem bons resultados, são o MeJa, seguido pelo SA, apresentando aumentos entre 1,5-7,0 vezes e 1,3-48,9 vezes na produção do composto respectivamente. Mas todos os elicitores analisados apresentaram bons resultados dentro da pesquisa proposta, ressaltando o uso do alginato na produção de gliceolina, obtendo um aumento de 85,3 vezes na produção do composto.

Essas pesquisas trazem então novas possibilidades de se usar recursos de fontes vegetais de maneira controlada e em larga escala. Visto que os metabólitos secundários são produzidos em baixa quantidade pela planta, existe um desafio em se produzir compostos em laboratório para uso comercial em larga escala, pensando na demanda dos mesmos pela população mundial. Algumas empresas possuem linhagens de células mantidas em criopreservação, as quais podem substituir a extração de plantas na natureza, uma vez que as mesmas são mantidas e reproduzidas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, S.; SAXENA, P.; ALI, A.; KHAN, S.; ABDIN, M. Z. Comparative study of withanolide production and the related transcriptional responses of biosynthetic genes in fungi elicited cell suspension culture of *Withania somnifera* in shake flask and bioreactor. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 114, p. 19-28, 2017.
- AHMADI-SAKHA, S.; SHARIFI, M.; NIKNAM, V. Bioproduction of phenylethanoid glycosides by plant cell culture of *Scrophularia striata* Boiss.: From shake-flasks to bioreactor. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 124, p. 275-281, 2016.
- AHMED, S. A.; BAIG, M. M. V. Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 499-504, 2014.
- ALI, A. M. A.; EL-NOUR, M. E. M.; YAGI, S. M. Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus, and callus treated with some elicitors. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2018.
- ALI, M. B.; YU, K.; HAHN, E.; PAEK, K. Differential responses of anti-oxidants enzymes, lipoxygenase activity, ascorbate content and the production of saponins in tissue cultured root of mountain *Panax ginseng* C. A. Mayer and *Panax quinquefolium* L. in bioreactor subjected to methyl jasmonate stress. **Plant Science**, v. 169, n. 1, p. 83-92, 2005.
- ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Planaltina: Embrapa Cerrados**, 16 p., 2002.
- ANGELOVA, Z.; GEORGIEV, S.; ROOS, W. Elicitation of plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 20, n. 2, p. 72-83, 2006.
- AOYAGI, H. Application of plant protoplasts for the production of useful metabolites. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, p. 1-8, 2011.

BAENAS, N.; GARCÍA-VIGUERA, C.; MORENO, D.A. Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. **Molecules**, v. 19, p. 13541-13563, 2014.

BAQUE, A.; MOH, S.; LEE, E.; ZHONG, J.; PAEK, K. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1255-1267, 2012.

BAYRAKTAR, M.; NAZIRI, E.; AKGUN, I. H.; KARABEY, F.; ILHAN, E.; AKYOL, B.; BEDIR, E.; GUREL, A. Elicitor induced stevioside production, *in vitro* shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, p. 289-300, 2016.

BRAGA, M. R.; DIETRICH, S. M. C. Defesas químicas de plantas: Fitoalexinas. **Acta Botanica Brasilica**, v. 1, n. 1, p. 3-16, 1987.

CAI, Z.; KASTELL, A.; MEWIS, I.; KNORR, D.; SMETANSKA, I. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, p. 401-409, 2012.

CELIS, A.; MENDOZA, C.; PACHÓN, M.; CARDONA, J.; DELGADO, W.; CUCA, L. E. Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. **Agronomía Colombiana**, v. 26, n. 1, p. 97-106, 2008.

CHODISETTI, B.; RAO, K.; GANDI, S.; GIRI, A. Gymnemic acid enhancement in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* by using the signaling molecules – methyl jasmonate and salicylic acid. **In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**, v. 51, p. 88-92, 2015.

COHEN, S.; FLESCHER, E. Methyl jasmonate: A plant stress hormone as an anti-cancer drug. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1600-1609, 2009.

DOWOM, S. A.; ABRISHAMCHI, P.; RADJABIAN, T.; SALAMI, S. A. Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with

Ag⁺ ions, methyl jasmonate and yeast extract. **Industrial Crops & Products**, v. 103, p. 81-88, 2017.

EDER, J.; COSIO, E. G. Elicitors of Plant Defense Responses. **International Review of Cytology**, v. 148, p. 1-36, 1994.

FARAG, M. A.; MEKKY, H.; EL-MASRY, S. Metabolomics driven analysis of *Erythrina lysistemon* cell suspension culture in response to methyl jasmonate elicitation. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 5, p. 681-689, 2016.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em culturas de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GABR, A. M. M.; GHAREEB, H.; SHABRAWI, H. M. E.; SMETANSKA, I.; BEKHEET, S. A. Enhancement of silymarin and phenolic compound accumulation in tissue culture of Milk thistle using elicitor feeding and hairy root cultures. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 327-333, 2016.

GAJULA, H.; KUMAR, V.; VIJENDRA, P. D.; RAJASHEKAR, J.; SANNABOMMAJI, T.; BASAPPA, G. A combination of elicitor and precursor enhances psoralen production in *Psoralea corylifolia* Linn. suspension cultures. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 685-691, 2018.

GIRI, C. C.; ZAHEER, M. Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 126, n. 1, p. 1-18, 2016

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831-2846, 2007.

INYAI, C.; UDOMSIN, O.; KOMAIKUL, J.; TANAKA, H.; SRITULARAK, B.; PUTALUN, W. Enhancement mulberroside A production in *Morus alba* L. cell cultures by calcium alginate immobilization and elicitation. **The International Conference on Herbal and Traditional Medicine**, 6p., 2015.

JAISI, A.; PANICHAYUPAKARANANT, P. Increased production of plumbagin in *Plumbago indica* root cultures by biotic and abiotic elicitors. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 351-355, 2016.

JIANG, Y. J.; PIAO, X. C.; LIU, J. S.; JIANG, J.; LIAN, Z. X.; KIM, M. J.; LIAN, M. L. Bioactive compound production by adventitious root culture of *Oplopanax elatus* in balloon-type airlift bioreactor systems and bioactivity property. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, p. 413-425, 2015.

JIAO, J.; GAI, Q.; WANG, X.; QIN, Q.; WANG, Z.; LIU, J.; FU, Y. Chitosan elicitation of *Isatis tinctoria* L. hairy root cultures for enhancing flavonoid productivity and gene expression and related antioxidant activity. **Industrial Crops & Products**, v. 124, p. 28-35, 2018.

JIN, M.; HAN, L.; LI, H.; WANG, H.; PIAO, X.; LIAN, M. Kinsenoside and polysaccharide production by rhizome culture of *Anoectochilus roxburghii* in continuous immersion bioreactor systems. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 131, n. 3, p. 527-535, 2017.

KHAN, T.; ABBASI, B. H.; KHAN, M. A. The interplay between light, plant growth regulators and elicitors on growth and secondary metabolism in cell cultures of *Fagonia indica*. **Journal of Photochemistry & Photobiology**, v. 185, p. 153-160, 2018.

KHAN, T.; ABBASI, B. H.; KHAN, M. A.; AZEEM, M. Production of biomass and useful compounds through elicitation on adventitious root cultures of *Fagonia indica*. **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 451-457, 2017.

KOCHAN, E.; SZYMCZYK, P.; KUZMA, L.; LIPERT A.; SZYMANSKA, G. Yeast extract stimulates ginsenoside production in hairy root cultures of American ginseng cultivated in shake flasks and nutrient sprinkle bioreactors. **Molecules**, n. 22, 15 p., 2017.

KRISHNAN, J. J.; GANGAPRASAD, A.; SATHEESHKUMAR, K. Exogenous methyl jasmonate acts as a signal transducer in the enhancement of camptothecin (CPT) production from *in vitro* cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. var. *angustifolia*(Thw.) Hook. f. **Industrial Crops and Products**, v. 119, p. 93-101, 2018.

KRSTIĆ-MILOŠEVIĆ, D.; JANKOVIĆ, T.; UZELAC, B.; VINTERHALTER, D.; VINTERHALTER, B. Effect of elicitors on xanthone accumulation and biomass production in hairy root cultures of *Gentiana dinarica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, p. 631-640, 2017.

KUMAR, P.; SRIVASTAVA, V.; CHATURVEDI, R.; SUNDAR, D.; BISARIA, V. S. Elicitor enhanced production of protoberberine alkaloids from *in vitro* cell suspension cultures of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers ex Hook. F. & Thoms. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, p. 417-426, 2017.

MAHENDRAN, D.; KISHOR, P. B. K.; SREERAMANAN, S.; VENKATACHALAM, P. Enhanced biosynthesis of colchicine and thiocolchicoside contents in cell suspension cultures of *Gloriosa superba* L. exposed to ethylene inhibitor and elicitors. **Industrial Crops & Products**, v. 120, p. 123-130, 2018.

MALAYAMAN, V.; SISUBALAN, N.; SENTHILKUMAR, R. P.; MOHAMED, S. S.; RANJITHKUMAR, R.; BASHA, M. G. Chitosan mediated enhancement of hydrolysable tannin in *Phyllanthus debilis* Klein ex Willd via plant cell suspension culture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1656-1663, 2017.

MAQSOOD, M.; ABDUL, M. Yeast extract elicitation increases vinblastine vincristine yield in protoplast derived tissues and plantlets in *Catharanthus roseus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 5, p. 549-556, 2017.

MEJÍA-ESPEJEL, L.; ROBLEDO-PAZ, A.; LOZOYA-GLORIA, E.; PEÑA-VALDIVIA, C. B.; CARRILLO-SALAZAR, J. A. Elicitors on steviosides production in *Stevia rebaudiana* Bertoni calli. **Scientia Horticulturae**, v. 242, p. 95-102, 2018.

MENDOZA, D.; CUASPUD, O.; ARIAS, J. P.; RUIZ, O.; ARIAS, M. Effect of salicylic acid and methyl jasmonate in the production of phenolics compounds in plant cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. **Biotechnology Reports**, v. 19, 9 p., 2018.

MURTHY, H. N.; LEE, E.; PAEK, K. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1-16, 2014.

OCHOA-VILLARREAL, M.; HOWAT, S.; HONG, S.; JANG, M. O.; JIN, Y.; LEE, E.; LOAKE, G. J. Plant cell culture strategies for the production of natural products. **BMB Reports**, v. 49, n. 3, p. 149-158, 2016.

PAEK, K. Y.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E. J. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, p. 287-300, 2005.

PAVARINI, D. P.; PAVARINI, S. P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5-16, 2012.

PERASSOLO, M.; CARDILLO, A. B.; MUGAS, M. L.; MONTOYA, S. C. N.; GIULIETTI, A. M.; TALOU, J. R. Enhancement of anthraquinone production and release by combination of culture medium selection and methyl jasmonate elicitation in hairy root cultures of *Rubia tinctorum*. **Industrial Crops & Products**, v. 105, p. 124-132, 2017.

PHYTON BIOTECH. **Phyton Biotech**. Disponível em: <https://phytonbiotech.com/>. Acessado em: 03 dez. 2018.

PICHYANGKURA, R.; CHADCHAWAN, S. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 49-65, 2015.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PORTU, J.; LÓPEZ, R.; BAROJA, E.; SANTAMARÍA, P.; GARDE-CERDÁN, T. Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: Methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. **Food Chemistry**, v. 201, p. 213-221, 2016.

PRAKASH, G.; SRIVASTAVA, A. K. Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 218-226, 2008.

SARKATE, A.; BANERJEE, S.; MIR, J. I.; ROY, P.; SIRCAR, D. Antioxidant and cytotoxic activity of bioactive phenolic metabolites isolated from the yeast-extract treated cell culture of apple. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 130, p. 641-649, 2017.

SEIGLER, D. S. Plant secondary metabolism. **Springer Science + Business Media**, 758 p., 1998

SHABANI, L.; EHSANPOUR, A. A.; ASGHARI, G.; EMAMI, J. Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. **Fiziologiya Rastenii**, v. 56, n. 5, p. 688-694, 2009.

SHAHIDI, F.; HO, C. Phenolics in food and natural health products: an overview. **ACS Symposium Series**, American Chemical Society, Washington, DC, 2005.

SIVANANDHAN, G.; ARUN, M.; MAYAVAN, S.; RAJESH, M.; JEYARAJ, M.; DEV, G. K.; MANICKAVASAGAM, M.; SELVARAJ, N.; GANAPATHI, A. Optimization of elicitation conditions with methyl jasmonate and salicylic acid to improve the productivity of withanolides in the adventitious root culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 681-696, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed. p. 309-332, 2004.

THANH, N. T.; MURTHY, H. N.; YU, K.; JEONG, C. S.; HAHN, E.; PAEK, K. Effect of oxygen supply on cell growth and saponin production in bioreactor cultures of *Panax ginseng*. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, n. 12, p. 1337-1341, 2006.

UDOMSIN, O.; YUSAKUL, G.; KRAITHONG, W.; UDOMSUK, L.; KITISRIPANYA, T.; JUENGWATANATRAKUL, T.; PUTALUN, W. Enhanced accumulation of high-value deoxymiroestrol and isoflavonoids using hairy root as a sustainable source of *Pueraria candollei* var. *mirifica*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, p. 1-11, 2018.

VASCONSUELO, A.; BOLAND, R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. **Plant Science**, v. 172, n. 5, p. 861-875, 2007.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado**, 16 p., 2010.

WANG, J.; LI, J.; LI, J.; LI, J.; LIU, S.; HUANG, L.; GAO, W. Production of active compounds in medicinal plants: from plant tissue culture to biosynthesis. **Chinese Herbal Medicines**, v. 9, n. 2, p. 115-125, 2017.

WANG, K.; PENG, Q.; QIAO, Y.; LI, Y.; SUO, D.; SHI, B. Different glyceollin synthesis-related metabolic content and gene expressions in soybean callus suspension cultures and cotyledon tissues induced by alginate oligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 73, p.188-196, 2018.

WILSON, S. A.; ROBERTS, S. C. Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for synthesis and biomolecules. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 3, p. 249-268, 2012.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

WINK, M. Functions and biotechnology of plant secondary metabolites. 2^a ed., **Annual Plant Reviews**, v. 39, 417 p., 2010.

WU, J.; SHI, M. Ultrahigh diterpenoid tanshinone production through repeated osmotic stress and elicitor stimulation in fed-batch culture of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 441-448, 2008.

YU, Y.; ZHANG, W.; LI, X.; PIAO, X.; JIANG, J.; LIAN, M. Pathogenic fungal elicitors enhance ginsenoside biosynthesis of adventitious roots in *Panax quinquefolius* during bioreactor culture. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 729-735, 2016.

ZHAO, J.; ZHOU, L.; WU, J. Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 137-144, 2010.